



Departamento de Ingeniería  
Química y Tecnologías  
del Medio Ambiente  
**Universidad Zaragoza**



Facultad de Ciencias  
**Universidad Zaragoza**

MÁSTER EN QUÍMICA INDUSTRIAL

# TRABAJO FIN DE MÁSTER

## APLICACIÓN DE PROCESOS ELECTROQUÍMICOS PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS

**AUTOR:** NATALIA MOSTOLAC VALIOS

**DIRECTORA:** ROSA MOSTEO ABAD

**CODIRECTORA:** MIRIAM OLIVA ALCUBIERRE

Facultad de Ciencias / Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente

2017/2018

## Agradecimientos

Quisiera agradecer al departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza, en especial al grupo de investigación de referencia 'Agua y Salud Ambiental' la oportunidad de realizar este Trabajo Fin de Máster con ellos. Más concretamente a mis tutoras, Rosa Mosteo y Miriam Oliva por la oferta del mismo y por su labor en él.

También a Dayana Jojoa por su apoyo y guía durante la realización de este proyecto.

A Víctor y Raquel por su paciencia ante las adversidades.

Y por supuesto a Gemma Cepriá por estar siempre que lo necesité, por su sinceridad, sus consejos y su apoyo en mi recorrido, tanto académico como personal.

## Aplicación de procesos electroquímicos para el tratamiento de aguas

Debido a la creciente preocupación sobre la alta contaminación de las aguas a causa tanto de contaminantes emergentes como de microorganismos potencialmente patógenos, se están proponiendo diferentes medios de eliminación tanto para compuestos orgánicos, como son fármacos o pesticidas, como para agentes patógenos con el fin de reducir su concentración en las aguas residuales y así evitar los posibles problemas medio ambientales graves, como la resistencia de bacterias a ciertos fármacos.

En este trabajo se proponen diferentes procesos para la eliminación del antibiótico enrofloxacin, perteneciente a la familia de las fluoroquinolonas, y para la eliminación de agentes patógenos como *Escherichia coli* y *Enterococcus spp.* Mediante procesos electroquímicos de oxidación avanzada, siendo los procesos en los que están implicadas las especies activas de cloro los más eficaces, más concretamente, el que promueve la reacción electrofoto-Fenton.

## Electrochemical processes application for water treatment

Due to the increasing concern about the high water contamination caused by emerging pollutants and by pathogens different ways of elimination have been proposed for organic compounds, such as drugs or pesticides, and for pathogens in order to reduce their concentration in water and prevent environmental problems they could cause, like bacterial resistance.

In this work, different processes for the elimination of the antibiotic enrofloxacin, belonging to the fluoroquinolones family, have been proposed and for pathogens elimination, such as *Escherichia coli* and *Enterococcus spp.* Through electrochemical processes of advanced oxidation. The processes which involve active chlorine species are the most effective ones, more specifically, the process that promote electrophoto-Fenton reaction.

## Abreviaciones

AA: actividad antibiótica

AR: agua residual urbana

DSA: ánodo dimensionalmente estable

EACl: especies activas de cloro

EDG: electro difusión de gas

ENR: enrofloxacin

OE: oxidación electroquímica

ROS: especies reactivas de oxígeno

# ÍNDICE

<b>1. Introducción</b>	6
<b>2. Objetivos y planteamiento del trabajo</b>	8
<b>3. Muestra</b>	8
<b>4. Metodología analítica</b>	9
4.1. <u>Descripción instalación</u>	9
4.2. <u>Condiciones de operación</u>	9
4.2.1 Oxidación electroquímica	9
4.2.2. Procesos electroquímicos de oxidación avanzada	10
4.2.2.1. Electro-Fenton	10
4.2.2.2. Electrofoto-Fenton	10
4.3. <u>Parámetros de control</u>	11
4.3.1. Determinación de oxidantes	11
4.3.1.1. Formación de especies activas de cloro (HClO, ClO <sup>-</sup> y Cl <sub>2</sub> )	11
4.3.1.2. Formación de peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	11
4.3.2. Determinación de la mineralización del antibiótico (COT)	12
4.3.3. Evolución de la concentración del antibiótico	12
4.3.4. Actividad Antimicrobiana	12
4.3.5. Evaluación de desinfección	13
4.4. <u>Planificación de experimentos</u>	14
<b>5. Resultados</b>	14
5.1. <u>Selección de electrodos</u>	14
5.1.1 Selección de ánodo	14
5.1.2 Selección cátodo	17
5.2. <u>Evaluación de los procesos de degradación</u>	18
5.2.1. Análisis de la evolución de la concentración de ENR y mecanismos de degradación propuestos	18
5.2.2. Análisis de la evolución del COT, pH y AA.	20
5.2.3. Influencia de la matriz acuosa	23
5.3. <u>Procesos de desinfección</u>	24
<b>6. Conclusiones</b>	27
<b>7. Bibliografía</b>	28
<b>8. Anexos</b>	32

## 1. Introducción

El agua es de vital importancia en los seres vivos, ya que es el principal agente termorregulador de los organismos porque la mayoría de las reacciones bioquímicas en el organismo se producen en disolución acuosa y porque al menos dos terceras partes del cuerpo humano son agua [1]. Pero no sólo es indispensable en los organismos, el agua también es utilizada en la industria, usos domésticos, servicios...

El agua se consideró un recurso disponible ilimitado pero debido a su alta demanda y la gran sobreexplotación de este recurso natural, actualmente, se considera escaso en algunas zonas geográficas debido a su desperdicio y mala gestión y al empeoramiento en su calidad, por el vertido de sustancias contaminantes de origen industrial y doméstico. Estas aguas se denominan aguas residuales [2] y deben ser depuradas para su devolución a su cauce natural y así evitar posibles problemas medio ambientales.

Actualmente, existe una creciente preocupación por la gran cantidad de bacterias patógenas en los ríos [3]. Por otro lado, además de las sustancias reguladas hasta ahora, un nuevo grupo de contaminantes denominados como emergentes (microplásticos, sustancias farmacéuticas), alarman a la comunidad científica ya que ponen en riesgo la salubridad del agua no sólo para el consumo humano sino que también ponen en riesgo el equilibrio medioambiental [4]. Un grupo de contaminantes que llama significativamente la atención está asociado a la industria farmacéutica, en éstas se sintetizan y/o aíslan compuestos biológicamente activos, estructuralmente más estables que otros compuestos orgánicos y con funciones particulares que pueden alterar a poblaciones o individuos presentes en matrices acuosas, tal es el caso de los antibióticos, los cuales han sido ampliamente detectados en ríos, quebradas, lagos, entre otros. Su presencia expone a las bacterias potencialmente patógenas a estrés evolutivo que puede derivar en la generación de cepas resistentes a las medicaciones convencionalmente usadas tanto en animales como en seres humanos [5] [6].

El tratamiento de las aguas residuales urbanas está regulado por la normativa europea en la Directiva 91/271/CEE [7], la cual define los sistemas de recogida, tratamiento y vertido de las aguas residuales. Allí, se establece los límites de vertido de parámetros como la DBO<sub>5</sub>, DQO, sólidos en suspensión totales, Nitrógeno y Fosforo por lo que las estaciones depuradoras de aguas residuales urbanas (EDAR) no tienen ninguna etapa específica para la eliminación de microorganismos ni para la reducción de contaminantes emergentes [8], detectados en los últimos años en este tipo de aguas residuales urbanas ya que muchos de estos contaminantes son productos de cuidado personal y fármacos [9].

Las aguas residuales urbanas depuradas también pueden ser reutilizadas antes de su vertido al medio receptor. El RD 1620/2007 [10] regula la reutilización de las aguas residuales urbanas depuradas y establece normas de calidad para los distintos usos que se puede hacer del agua, (urbano, agrícola, industrial, recreativo o ambiental, nunca para consumo humano) y establece valores máximos para algunos microorganismos como la *Escherichia coli*, *Legionella spp.* o *Salmonella spp.*, entre otros parámetros. En muchas ocasiones es necesario un tratamiento adicional del agua para cumplir con dichas normas de calidad, los cuales se denominan procesos de regeneración. Este tratamiento adicional sirve para adecuar la calidad de las aguas y así reutilizarlas en procesos donde la calidad sea menos exigente y, por tanto,

hacer un mejor uso del agua. Este tratamiento se lleva a cabo en las estaciones regeneradoras de aguas residuales (ERAR).

Para eliminar contaminantes como microorganismos y antibióticos existen diferentes métodos ya estudiados, como por ejemplo, la cloración, que consiste en hacer reaccionar los compuestos orgánicos del medio con cloro o hipoclorito de sodio/calcio clorándolos u oxidándolos [11].

Otro método es la ozonización directa o indirecta [12]. La forma directa consiste en la reacción de ozono con los compuestos orgánicos oxidándolos y la manera indirecta consiste en provocar la descomposición del agua en radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), donde estos últimos son los que reaccionan con los compuestos del medio. La principal diferencia de las dos formas radica en que la forma directa es muy selectiva a los dobles enlaces.

La fotocatalisis es otro método de eliminación, que consiste en utilizar un catalizador semiconductor, el cual al ser irradiado, pasa a un estado excitado generando la promoción de un electrón y un hueco, los cuales dan lugar a especies reactivas de oxígeno (ROS) [13]. El fotocatalizador más utilizado es el dióxido de titanio por su gran estabilidad, su alta actividad fotocatalítica, su bajo impacto medio ambiental y su bajo coste [14].

Por otro lado se encuentran los procesos electroquímicos de oxidación avanzada (POA) que permiten la eliminación del contaminante por transferencia de electrones entre electrodos o en la generación *in situ* de especies oxidantes capaces de atacar al contaminante del medio produciendo cambios en la estructura de la molécula. Un tipo de POA es el proceso Fenton, el cual consiste en la generación de radicales hidroxilo  $\cdot\text{OH}$  por activación del peróxido de hidrógeno del medio mediante el ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en medio ácido [15]. Otro ejemplo de POA es el proceso electro-Fenton, que consiste en la activación del peróxido de hidrógeno generado *in situ* mediante el ion  $\text{Fe}^{2+}$  para generar radicales  $\cdot\text{OH}$ . Si el proceso se lleva a cabo con radiación solar recibe el nombre de electrofoto-Fenton, al irradiar luz se acelera la mineralización de los compuestos orgánicos, logrando una mayor eficiencia de la degradación de los contaminantes.

Por ello, este trabajo se ha centrado en la eliminación de microorganismos potencialmente patógenos y antibióticos como la enrofloxacin (ENR), perteneciente a la familia de las fluoroquinolonas, presentes en las aguas residuales mediante procedimientos electroquímicos y fotoelectroquímicos. Además, en este trabajo de investigación se ha estudiado la influencia del uso de diferentes electrodos en el proceso utilizando como matriz acuosa agua destilada con la intención de comprender el sistema y posteriormente se estudió la degradación de la ENR y su actividad antibiótica (AA) en una matriz real. Además se consideró el poder oxidante del proceso para desinfección de bacterias tanto Gram-positiva como Gram-negativa indicadoras de contaminación hídrica.

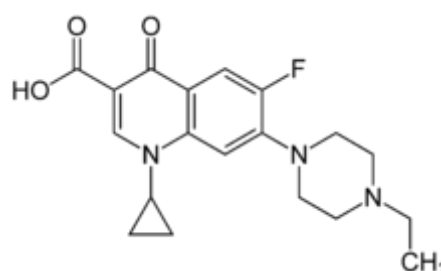


Figura 1. Enrofloxacin

## 2. Objetivos y planteamiento del trabajo

El objetivo principal del trabajo de investigación es evaluar distintos procesos electroquímicos para la eliminación de un contaminante orgánico (enrofloxacin) y gérmenes patógenos (*E. coli* y *Enterococcus spp.*) presentes en aguas con el fin de mejorar la calidad de dicha agua. Los objetivos secundarios se desglosan a continuación:

1. Poner en marcha las metodologías que permitan el seguimiento y control de los experimentos a realizar.
2. Evaluar dos materiales anódicos para conocer cuál es el más eficiente para el proceso propuesto.
3. Evaluar dos materiales catódicos para conocer cuál es el más eficiente para el proceso propuesto.
4. Determinar qué configuración experimental es la más apropiada para la degradación de enrofloxacin y su actividad antibiótica.
5. Determinar qué configuración experimental es la más apropiada para la desinfección de *Escherichia coli* y *Enterococcus spp.*
6. Aprender a interpretar los resultados experimentales obtenidos y deducir las conclusiones de los mismos.
7. Aplicar y adaptar el procedimiento a una muestra real.

## 3. Muestra

En este trabajo de investigación se utilizan las muestras que se indican a continuación:

- Muestra A: matriz agua destilada con NaCl 0,05M como electrolito soporte.
- Muestra B: matriz agua destilada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05M como electrolito soporte.
- Muestra C: matriz agua destilada con NaCl 0,05M como electrolito soporte y 18 mg/L de enrofloxacin.
- Muestra D: matriz agua destilada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05M como electrolito soporte y 18 mg/L de enrofloxacin.
- Muestra E: matriz agua de salida de la EDAR de Tudela con NaCl 0,05M como electrolito soporte con 18 mg/L de enrofloxacin.
- Muestra F: matriz agua destilada con NaCl 0,05M como electrolito soporte y 10<sup>5</sup> UFC/100mL de *Escherichia coli* y 10<sup>5</sup> UFC/100mL de *Enterococcus spp.*
- Muestra G: matriz agua destilada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05M como electrolito soporte y 10<sup>5</sup> UFC/100mL de *Escherichia coli* y 10<sup>5</sup> UFC/100mL de *Enterococcus spp.*



Se decidió trabajar con la enrofloxacin porque es un antimicrobiano considerado poco tóxico con una gran aplicación en uso veterinario, y por tanto, se espera que haya una cantidad significativa en las aguas a tratar [16].

Para comprobar que la concentración es la correcta se mide la longitud de onda de la disolución a 277 nm y se observa si el valor es similar a 1,800.

Todas las disoluciones se prepararon a partir de agua destilada 0,2  $\mu\text{S}/\text{cm}$  filtrada en un equipo Ecomatic Type II. Analytical Grade Water Wasserlab.

## 4. Metodología analítica

### 4.1. Descripción instalación

Los ensayos se realizan en una celda electroquímica no dividida de vidrio con forma cilíndrica con 250 mL de capacidad (Figura 2). La instalación está equipada con un ánodo DSA (ánodo dimensionalmente estable) de  $\text{IrO}_2$  o  $\text{IrO}_2$  dopado con Sn y Sb, ambos con un área de superficie de  $2,25 \text{ cm}^2$ , y un cátodo de Ti ( $2,25 \text{ cm}^2$ ), también un cátodo de electro difusión de gas (EDG), con una malla ELAT<sup>TM</sup> LT-1400 o CeTech Carbon Cloth with MPL - W1S1009, ambas con un área de superficie de  $3,1 \text{ cm}^2$ , con aire bombeado con una bomba de aire Eheim 100 a un flujo de 2,5 L/min. La densidad de corriente utilizada para todos los ensayos es  $6,94 \text{ mA cm}^{-2}$  con una fuente de corriente constante (0,02 A).

El pH de la disolución se midió con el pHmetro y se observó que en todos los casos tuvo un valor de aproximadamente 6.

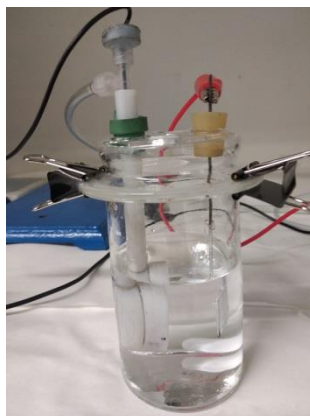


Figura 2. Celda electrolítica

### 4.2. Condiciones de operación

#### 4.2.1 Oxidación electroquímica

En este caso se utilizan las configuraciones de ánodo/cátodo mostradas en la Tabla 1:

Tabla 1. Configuración ánodo/cátodo

Ánodo	Cátodo
DSA	Ti
DSA dopado	Ti
DSA dopado	EDG

Los primeros experimentos se realizan con 200 mL de la muestra A para medir la cantidad de especies activas de cloro (EACI) producidas en cada ánodo, mientras que en los siguientes ensayos se utilizan 200 mL de la muestra B para cuantificar la cantidad de peróxido de hidrógeno producida en los distintos cátodos. Dicha cuantificación se encuentra explicada más adelante en esta memoria, en los apartados 4.3.1.1. y 4.3.1.2.

## 4.2.2. Procesos electroquímicos de oxidación avanzada

### 4.2.2.1. Electro-Fenton

Es un método de oxidación avanzada que consiste en generar peróxido de hidrógeno en la disolución, la cual contiene óxido de hierro, en este caso utilizando 7 ppm de wustita (FeO). Esta reacción se estudia para verificar si utilizando el óxido de hierro seleccionado favorece la formación de radicales hidroxilo mediante el proceso electro-Fenton [15], mediante la descomposición del peróxido de hidrógeno a radical hidroxilo y la oxidación de Fe (II) a Fe (III) como se muestra en la reacción (1).



Estudios anteriores demuestran que a pH 3 la reacción es catalítica y tiene lugar en fase homogénea, produciendo la máxima cantidad de radicales hidroxilo, ya que el Fe (III) puede descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno a través de un mecanismo en cadena [17]. Estas condiciones de tan bajo pH suponen un alto coste [18], por ello, en este trabajo se ha investigado a un pH cercano a la neutralidad, y se pretende determinar si el óxido seleccionado favorece la degradación mediante el proceso Fenton heterogéneo. Se ha elegido wustita porque es uno de los óxidos de hierro menos estudiados para estas reacciones. Una de las ventajas importantes en la utilización de wustita es que se permite retirarla del medio con un imán ya que es magnéticamente activa, y otra ventaja es que, al estar en estado sólido, favorece la reacción en pH neutro, aunque cabe la posibilidad de que cierta cantidad de Fe (II) se solubilice y, por tanto tenga lugar la reacción de manera homogénea y/o pase en la superficie del óxido, dando la reacción de manera heterogénea.

No obstante, la etapa limitante de este proceso es la regeneración de Fe (III) a Fe (II) [14], ecuación (2).



### 4.2.2.2. Electrofotofenton

Este proceso es igual al expuesto en el punto anterior con la diferencia de que se realiza en presencia de luz. La fuente de radiación utilizada es una cámara solar Suntest CPS+ Atlas.

Este proceso permite la regeneración del ión ferroso por la rápida descarboxilación de algunos complejos del  $\text{Fe}^{3+}$  (ecuación (3)) además de favorecer la mineralización de la materia orgánica [19]. También difiere en que al incorporar radiación solar el peróxido de hidrógeno descompone en radicales  $\cdot\text{OH}$  proporcionando al medio mayor cantidad de especies oxidantes, ecuación (4), [20].



La cámara solar utilizada está equipada con una lámpara de xenón que emite luz a una longitud de onda entre 290 y 800 nm. Tiene dos filtros, uno de cuarzo y otro adicional de ventana (Xenochrome 320), que cubren la lámpara para conseguir que la radiación se sitúe entre 320 y 800 nm, ya que es la radiación utilizada en los tratamientos de desinfección.

Todos los experimentos se realizaron a una irradiancia de 500 W/m<sup>2</sup>.

### 4.3. Parámetros de control

#### 4.3.1. Determinación de oxidantes

##### 4.3.1.1. Formación de especies activas de cloro (HClO, ClO<sup>-</sup> y Cl<sub>2</sub>)

Las especies activas de cloro producidas se determinan por el método indirecto yodométrico. Las alícuotas (600 µL) obtenidas a los 0, 3, 5, 10, 20 y 30 minutos de reacción se adicionan a una celda de cuarzo, para su análisis posterior mediante espectrofotometría, e inmediatamente después se añaden los siguientes reactivos: 1350 µL de yoduro de potasio (KI) al 10% y 50 µL de heptamolibdato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 0,01 mol L<sup>-1</sup>).

El KI debe estar en exceso para asegurarse de que todas las EACl reaccionan y se espera 6 minutos, para que la reacción tenga el tiempo suficiente para producirse, en oscuridad ya que el KI reacciona con la luz dando lugar a una reacción parásita no deseada.

El ácido hipocloroso formado reacciona con el yoduro de potasio añadido para generar cloruros y yodo, como se puede observar en la ecuación (5). El yodo proporciona una coloración anaranjada a la disolución, lo que hace posible medir la absorbancia de la disolución en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 350 nm.



Para la cuantificación de la concentración de las EACl se utiliza la recta de calibrado que se encuentra en el Anexo I.

##### 4.3.1.2. Formación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

El análisis de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realiza mediante el método del metavanadato para el cual alícuotas (500 µL) de las muestras tratadas a los tiempos de 0, 3, 5, 10, 20 y 30 minutos de reacción se adicionan a una celda de cuarzo, para su análisis posterior mediante espectrofotometría e inmediatamente se añadieron: 1340 µL de agua destilada y 160 µL de metavanadato amonio 0,0062M y 0,058 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

El metavanadato debe estar en exceso para asegurarse de que todo el peróxido de hidrógeno ha reaccionado.

El peróxido generado se reduce a agua al reaccionar con el metavanadato, el cual pasa al ion  $\text{VO}^{3+}$ , proporcionando una coloración amarilla a la disolución, la cual se mide a 450 nm en el espectrofotómetro.



Para la cuantificación la concentración del peróxido de hidrógeno se utiliza la recta de calibrado que se encuentra en el Anexo I.

#### 4.3.2. Determinación de la mineralización del antibiótico (COT)

El grado de mineralización del contaminante durante los diferentes tratamientos se determina midiendo el carbono orgánico total (COT) en un Analizador de carbono orgánico total (TOC 5000A) marca Shimadzu. Así se puede observar si el antibiótico se degrada totalmente a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  o por el contrario se producen especies secundarias.

#### 4.3.3. Evolución de la concentración del antibiótico

Para observar la evolución de la enrofloxacin se utiliza un cromatógrafo Autoinjector 2695, con una columna ACE C18 superxcel de 3 mm (100 x 4,6 mm) y un detector UV fijado a una longitud de onda de 280 nm. La fase móvil es acetonitrilo/disolución de ácido fórmico 0,02% (15/85, v/v), operado en modo isocrático a 30°C con un flujo de 1 mL/min y un volumen inyectado de 10 mL. Se observa así si la cantidad de antibiótico disminuye a lo largo del tiempo.

#### 4.3.4. Actividad Antimicrobiana

La actividad antimicrobiana (AA) se determina utilizando la prueba de sensibilidad de difusión en agar, la cual permite medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos. Además, permite observar el seguimiento de la degradación del antibiótico durante el experimento.

Este método consiste en sembrar *Staphylococcus Aureus* por agotamiento en placas de agar nutritivo Merk (la preparación se encuentra en el Anexo II) y se depositan discos de papel de filtro, los cuales incorporan el antibiótico impregnado. Dichas placas se incuban invertidas a 36,5°C en la estufa durante 24 horas. Posteriormente, se estudia el crecimiento de las bacterias en ellas en función del halo formado midiendo el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco y se observa si el antibiótico ha sido degradado por el proceso. Cuanto más pequeño sea el diámetro del halo más se habrá degradado el antibiótico y, por tanto, más eficaz es el proceso, tal y como se muestra en la Figura 3.

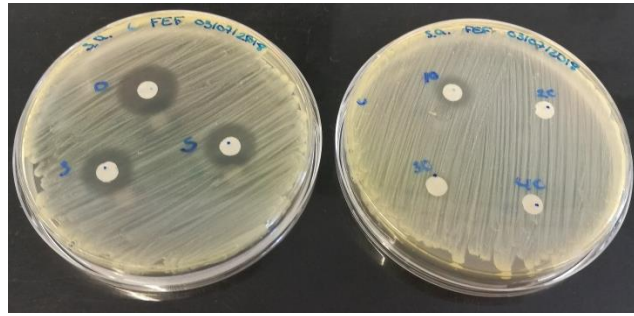


Figura 3. Ejemplo de una medida de AA

#### 4.3.5. Evaluación de desinfección

Para hallar la eficacia del método se observa el crecimiento microbiano en medios de cultivo, dichos medios proporcionan los nutrientes necesarios a las bacterias para favorecer su crecimiento en colonias y poder contabilizarlas.

En este caso, la siembra se realiza por el método de siembra en superficie, la cual consiste en colocar un pequeño volumen de alícuota de muestra (100  $\mu$ L si la placa es  $\varnothing$  90 cm o 50  $\mu$ L si es de  $\varnothing$  45 cm).

Dicha alícuota se pipetea de muestras tomadas en los tiempos 0, 3, 5, 10, 15 y 30 minutos y a las cuales se les somete a un proceso de diluciones decimales seriadas como se muestra en la Figura 4.

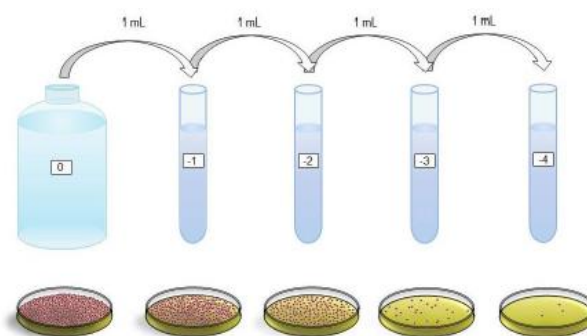


Figura 4. Disoluciones decimales seriadas

Estas disoluciones se realizan tomando 1 mL de la muestra y pipeteándola en un tubo con 9 mL de una disolución estéril de NaCl al 0,9%. Para homogeneizar dicho tubo se tapa y se agita manualmente. Así se obtiene la dilución -1. Las diluciones sucesivas se preparan del mismo modo que el caso anterior pero en vez de tomar 1 mL de la muestra madre, se toma de la dilución inmediatamente anterior.

En este trabajo se utilizan las bacterias *Escherichia coli* (Gram-negativo) y *Enterococcus spp.* (Gram-positivo). Las primeras se incuban en medios de cultivo selectivo a éstas de Agar MacConkey a 45°C durante 24 horas y las segundas en Agar Slanetz & Bartley a 36°C durante 48 horas. La preparación de ambos cultivos se encuentra en el Anexo II.

La medida utilizada en este método son unidades formadoras de colonias (UFC)/100 mL. Dicho nombre viene de que una colonia procede de la multiplicación de una célula o de un conjunto de éstas, pero no todas las células son capaces de formar colonias.

En este caso, para evaluar la eficacia del método se hace un seguimiento y los resultados se expresan en la disminución de órdenes de magnitud de bacterias inactivadas.

#### 4.4. Planificación de experimentos

En la Tabla 2 se muestran los diferentes experimentos realizados, en cuanto a la selección del ánodo y cátodo, así como para la eliminación del antibiótico (ENR) y de gérmenes patógenos. Se muestran los ánodos y cátodos utilizados, así como las diferentes condiciones de operación y los parámetros medidos.

Tabla 2. Resumen ensayos

Ensayo	Ánodo	Cátodo	Condiciones	Parámetros medidos
Selección ánodo	DSA (IrO <sub>2</sub> )	Ti	<ul style="list-style-type: none"> <li>Corriente: 0,02 A</li> <li>200 mL muestra A</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>[EACI]</li> <li>Evolución ENR ([ENR]/[ENR]<sub>0</sub>)</li> </ul>
	DSA dopado (IrO <sub>2</sub> Sn-Sb)			
Selección cátodo	DSA dopado	EDG ELAT™	<ul style="list-style-type: none"> <li>Corriente: 0,02 A</li> <li>200 mL muestra B</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]</li> </ul>
		EDG CeTech		
Eliminación ENR	DSA dopado	Ti	<ul style="list-style-type: none"> <li>Corriente: 0,02 A</li> <li>200 mL muestra C o D</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>[EACI]</li> <li>Evolución ENR ([ENR]/[ENR]<sub>0</sub>)</li> <li>Actividad antibiótica (AA)</li> </ul>
		EDG ELAT™	<ul style="list-style-type: none"> <li>Con/sin luz</li> <li>Con/sin wustita</li> </ul>	
	Ti	EDG ELAT™	<ul style="list-style-type: none"> <li>Corriente: 0,02 A</li> <li>200 mL muestra D</li> <li>Con/sin luz</li> <li>Con/sin wustita</li> </ul>	
	-	-	<ul style="list-style-type: none"> <li><u>Luz</u></li> <li>200 mL muestra C o D</li> </ul>	
Eliminación gérmenes patógenos	DSA dopado	Ti	<ul style="list-style-type: none"> <li>Corriente: 0,02 A</li> <li>200 mL muestra F o G</li> <li>Con/sin luz</li> <li>Con/sin wustita</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Disminución unidades logarítmicas de colonias formadas</li> </ul>
		EDG ELAT™		
	-	-	<ul style="list-style-type: none"> <li><u>Luz</u></li> <li>200 mL muestra F o G</li> </ul>	

## 5. Resultados

### 5.1. Selección de electrodos

#### 5.1.1 Selección de ánodo

Los ánodos dimensionalmente estables (DSA) son electrodos preparados térmicamente, compuestos por un soporte de titanio recubierto por mezcla de óxidos metálicos que pueden ser IrO<sub>2</sub>, RuO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub> y/o Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [21], y en algunos casos pueden estar dopados con SnO<sub>2</sub>, Sb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y PbO<sub>2</sub>, para mejorar su durabilidad y propiedades catalíticas [21]. Estos electrodos ya han sido probados en el tratamiento de aguas residuales para la eliminación de urea [22], pesticidas [23]

y tintes [24] [25]. Una ventaja de estos electrodos frente a los electrodos de diamantes dopado con boro (BDD) es que tienen un menor coste [26].

La elección del ánodo en este trabajo se basó en la cuantificación de especies activas de cloro (EACl) para comparar qué ánodo genera mayor cantidad de especies oxidantes o es capaz de degradar mayor cantidad de molécula en el mismo tiempo. Se compararon dos ánodos dimensionalmente estables (DSA), uno de IrO<sub>2</sub> y otro de IrO<sub>2</sub> dopado de Sn y Sb.

Para la selección del ánodo se utilizaron 200 mL de la muestra A (agua destilada con NaCl 0,05M), con una intensidad de corriente de 0,02 A y utilizando en ambos casos un cátodo de titanio. La Figura 5 muestra en el eje derecho la evolución del antibiótico (ENR),  $[ENR]/[ENR]_0$ , usando ambos ánodos, DSA sin dopar y DSA dopado y en el eje izquierdo las EACl formadas en ambos casos con y sin antibiótico frente al tiempo.

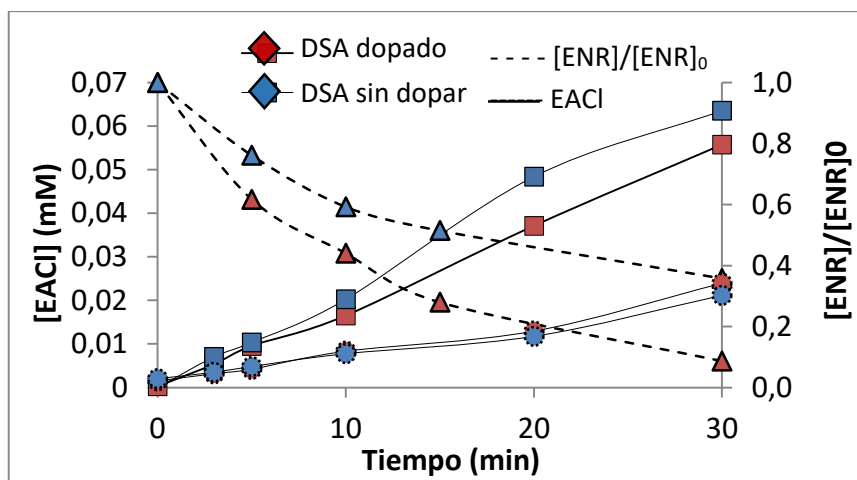


Figura 5. EACl formadas sin antibiótico (marcador □) y con antibiótico (marcador ○) y la evolución de la concentración del antibiótico con el tiempo (marcador Δ) (Muestra A)

Como puede observarse el seguimiento del antibiótico (marcador Δ), muestra diferencias en la degradación de la misma utilizando diferentes ánodos, pues para el ánodo dopado (marcador rojo) se logra una degradación del 90% mientras que en el caso del ánodo sin dopar (marcador azul) se consigue una degradación del 65%. Con el ánimo de identificar el mecanismo que propicia la eliminación del antibiótico (ENR) se cuantificó la cantidad de especies activas de cloro que pueden oxidar y, por tanto, dar lugar a la degradación de la ENR. Dichas especies se midieron para ambos ánodos en ausencia del antibiótico (marcador □) encontrándose semejanzas con trabajos ya realizados donde ambos electrodos (DSA sin dopar y DSA dopado) generan cantidades similares de EACl [27]. Las reacciones que tienen lugar en los electrodos se muestran en las reacciones 7 y 8. En ambos ánodos se favorece la formación de cloro, el cual desproporciona en ácido hipocloroso o en hipoclorito, dependiendo del pH del medio, y a cloruros (reacción 9). Como el pKa de este ácido es 7,53 y el pH del medio es 6, se formará el ácido hipocloroso, como se puede ver en la Figura 6, posible especie responsable de la transformación de la ENR.



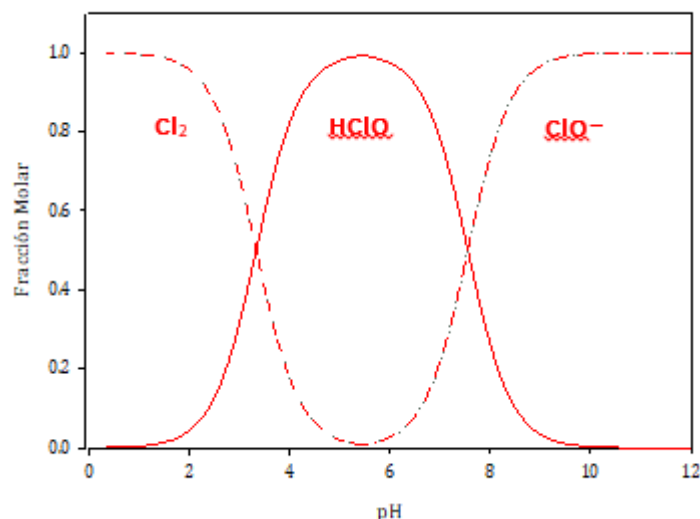


Figura 6. Especies de cloro en función del pH del medio [28]

Además en la Figura 5 también se puede observar que no hubo diferencias en el consumo de especies oxidantes en los experimentos en presencia de molécula (marcador o). Sin embargo, tal y como se ha comentado existen diferencias en los rendimientos de reducción del ENR al comparar los dos ánodos objeto de estudio (un 90 % con el ánodo dopado y aproximadamente un 65 % con el sin dopar). Este hecho podría estar relacionado con lo siguiente:

- Las mejoras que presentaría el ánodo DSA dopado como consecuencia del dopaje con estaño y antimonio. Según Kawar y cols. [29] se mejoran las propiedades conductoras proporcionando huecos justo por encima de la capa de valencia pero por debajo de la banda de conducción, disminuyendo así la energía de Fermi, es decir, la energía que necesita un electrón para promocionar como se puede observar en la Figura 7. Este dopaje permite un mayor flujo de electrones favoreciendo la formación de EACl. El dopaje también puede mejorar la durabilidad y propiedades catalíticas promoviendo otras vías de degradación [21].

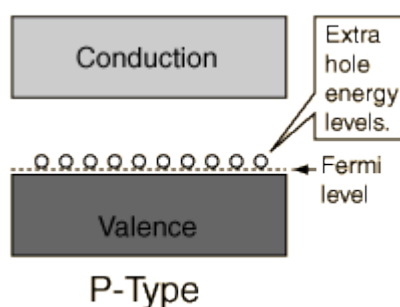


Figura 7. Semiconductor de tipo p

- Que parte del antibiótico se degrade por vía directa en la superficie del electrodo [30] debido a la presencia de  $\cdot\text{OH}$  en la superficie, debido al dopaje con Sn-Sb [26], los cuales promueven la degradación de la molécula.

Se eligió el ánodo de DSA dopado por tener una mayor eficacia de degradación de la enrofloxacin en el mismo tiempo que en el caso del ánodo DSA.



### 5.1.2 Selección cátodo

Los electrodos de electro difusión de gas (EDG) se caracterizan por la capacidad de producción de peróxido de hidrógeno que en presencia de iones ferrosos da lugar a la formación de radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) [31]. Son cátodos que se diferencian entre sí por la malla de carbono que contienen y en este trabajo se van a estudiar dos tipos de malla diferentes: una malla ELAT™ LT-1400W y otra CeTech Carbon Cloth with MPL – W1S1009. Por lo cual, el objetivo de este estudio es conocer cuál de los dos materiales disponibles es capaz de electrogenerar mayor cantidad de peróxido de hidrógeno bajo las mismas condiciones. Para ello se utilizan 200 mL de la muestra B, agua destilada usando como electrolito soporte sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,05M), que se caracteriza por no sufrir reacción en los distintos electrodos.

Se midió la generación de peróxido de hidrógeno en los ánodos por la posible recombinación de radicales  $\cdot\text{OH}$ , pero no se detectaron, por lo que se asumió que todo el peróxido de hidrógeno generado provenía de los cátodos.

A continuación se muestran las reacciones que ocurren en cada electrodo:



La Figura 8 muestra la concentración de peróxido de hidrógeno formado frente al tiempo utilizando los dos cátodos objeto de estudio. Se realizó con el fin de poder observar las diferencias de cada malla y poder elegir la más óptima para los posteriores experimentos. El ánodo utilizado en ambos caso fue el de titanio dando lugar a la reacción 11.

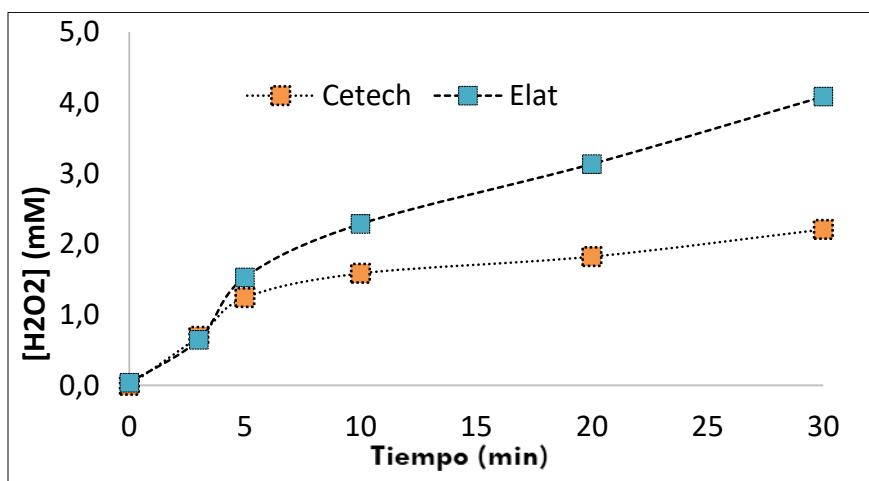


Figura 8. Seguimiento del peróxido de hidrógeno formado en cada cátodo a lo largo del tiempo (Muestra B)

En la Figura 8, se puede comprobar que con la malla ELAT™ se obtuvo 4 mM de peróxido de hidrógeno mientras que con la CeTech se obtuvo 2 mM. Esto puede ser debido a que la malla ELAT™ tiene una menor resistividad eléctrica (Tabla 3), por tanto se sugiere que habrá un mayor flujo de electrones capaces de producir mayor cantidad de peróxido de hidrógeno. Además, tiene una menor permeabilidad al aire por lo que posiblemente haya una mayor cantidad de oxígeno disponible en las proximidades del electrodo, generando una interfase que favorezca la formación de peróxido de hidrógeno en dicho electrodo.

Por tanto se eligió como cátodo, el de la malla ELAT™ ya que genera una mayor cantidad de peróxido de hidrógeno en el mismo tiempo. En este trabajo este electrodo se denominará cátodo EDG.

Tabla 3. Características de las dos mallas de carbono

	CeTech Carbon Cloth with MPL - W1S1009 [32]	ELAT™ LT-1400W [33]
<b>Tipo de Material</b>	Fibra de carbono tejida (tela)	Fibra de carbono tejida (tela)
<b>Espesor</b>	0,410 mm (410 $\mu$ m)	0,454 mm (454 $\mu$ m)
<b>Masa (g/m<sup>2</sup>)</b>	180	170
<b>Permeabilidad al aire</b>	< 8	0,104
<b>Resistividad Eléctrica</b>	< 13	0,17
<b>Capa microporosa</b>	Sí	Si

## 5.2. Evaluación de los procesos de degradación

### 5.2.1. Análisis de la evolución de la concentración de ENR y mecanismos de degradación propuestos

Tras la elección de los distintos electrodos (ánodo DSA dopado y cátodo EDG) se procedió a evaluar la degradación del antibiótico presente en la muestra C (agua destilada + NaCl 0,05M + 18 mg/L de ENR) en distintas condiciones de operación reflejadas en la tabla 2 (200 ml de muestra, con una intensidad de corriente de 0,02 A, con/sin luz y con/sin wustita). En la Figura 9 se muestra la evolución del antibiótico mediante el seguimiento por cromatografía,  $[ENR]/[ENR]_0$ , frente al tiempo, para en un ensayo sólo con luz (Luz) y de las diferentes configuraciones estudiadas de oxidación electroquímica con ánodo DSA dopado y diferentes cátodos: cátodo de titanio (OE), cátodo de difusión de gas (OE EDG), cátodo de difusión de gas con wustita (OE EDG W) y cátodo de difusión de gas con wustita y luz (OE EDG W Luz) (Tabla 2). La reacción electro-Fenton viene dada por la configuración OE EDG W, mientras que la reacción electrofoto-Fenton vienen dada por OE EDG W Luz.

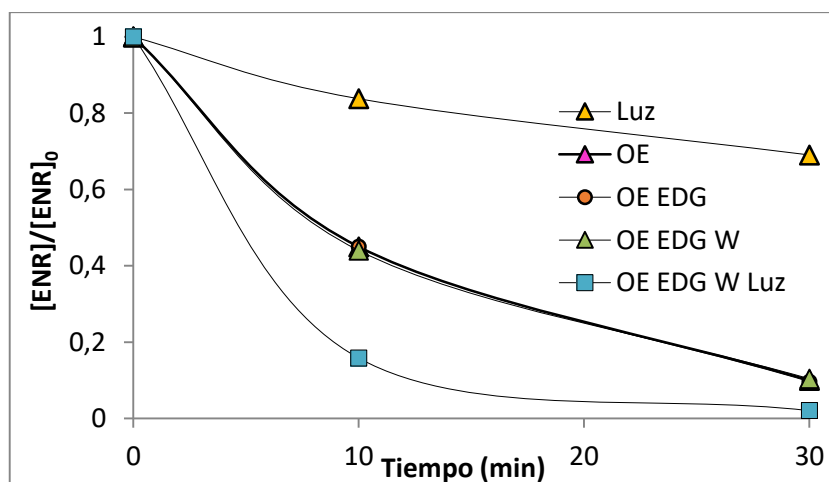


Figura 9. Evolución de ENR con el tiempo en disolución NaCl 0,05M y 18 mg/L ENR (Muestra C)

El ensayo sólo con luz se realizó para comprobar si el antibiótico es sensible a la fotodegradación. Como se puede observar en la Figura 9, hay una ligera disminución a lo largo del tiempo, llegando a reducir un 30% de la concentración de ENR. Dicha degradación se produce porque las fluoroquinolonas son sensibles a la luz [34], ya que se excitan generando un estado triplete (reacciones 12-13) el cual puede producir fotoproductos (reacción 14), reaccionar con oxígeno molecular para formar oxígeno en estado triplete (reacción 15) o reaccionar con oxígeno molecular en un proceso de transferencia de electrones para formar el anión superóxido y ENR catión radical (reacción 16) [8].



En el sistema de oxidación electroquímica con cátodo de titanio (OE) sirve para observar la influencia solamente de las EACl (Tabla 2) dando lugar las reacciones 7 y 8. Se observa en la Figura 9 una considerable mejora con respecto al ensayo sólo luz ya que las EACl atacan electrofílicamente a la ENR favoreciendo su degradación. Estudios realizados muestran que sobre la estructura de las fluoroquinolonas se favorece una sustitución electrofílica en el grupo amino de la piperazina, ver Figura 1, [27].

Por otra parte, en el ensayo en el que se utilizó el cátodo EDG y el ánodo DSA dopado (OE EDG), como se puede observar en la Figura 9, es posible determinar el efecto que tienen las especies activas de cloro y  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la degradación. La evolución del antibiótico bajo estas condiciones tiene una tendencia muy similar a la observada a la oxidación electroquímica (experimento OE), lo que implica que la especie oxidante predominante es las EACl, por tanto la transformación de la molécula como consecuencia de la presencia del peróxido de hidrógeno es escasa ya que su presencia no mejora la degradación de la molécula con respecto al ensayo de sólo OE.

Cuando se añadió wustita al medio de reacción (OE EDG W), se observaron resultados similares al caso anterior, donde la molécula consigue una buena degradación con el tiempo pero no se mejora con respecto al ensayo con el cátodo de titanio (OE).

Finalmente, se evaluó la reacción electrofoto-Fenton (OE EDG W Luz), en la cual se puede observar como a los 10 minutos de tratamiento ya se había degradado más del 80% y la degradación es casi completa a los 30 min de tratamiento (Figura 9). Esto puede estar relacionado con la generación de especies reactivas de oxígeno como consecuencia de la reacción Fenton.

La presencia de especies cloradas (EACl) tiene como principal desventaja la posible formación de trihalometanos (THM) durante la oxidación de contaminantes orgánicos [35] por lo que se utilizaron las mismas condiciones de operación que las mostradas anteriormente (Tabla 2) con la muestra D (agua destilada +  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,05M + 18 mg/L de ENR) y así estudiar la contribución del radical  $\cdot\text{OH}$  sobre la muestra, ver Figura 10, en la cual se representa la evolución

del antibiótico,  $[ENR]/[ENR]_0$ , frente al tiempo. Para ello, en algunas configuraciones se ha utilizado un ánodo de Ti en vez del ánodo DSA dopado según las siguientes configuraciones: solamente luz (Luz), ánodo de Ti y cátodo EDG (Ti EDG), ánodo de Ti y cátodo EDG con wustita (Ti EDG W), ánodo de Ti, cátodo EDG con wustita y luz (Ti EDG W Luz) y ánodo DSA dopado y cátodo EDG (OE EDG).

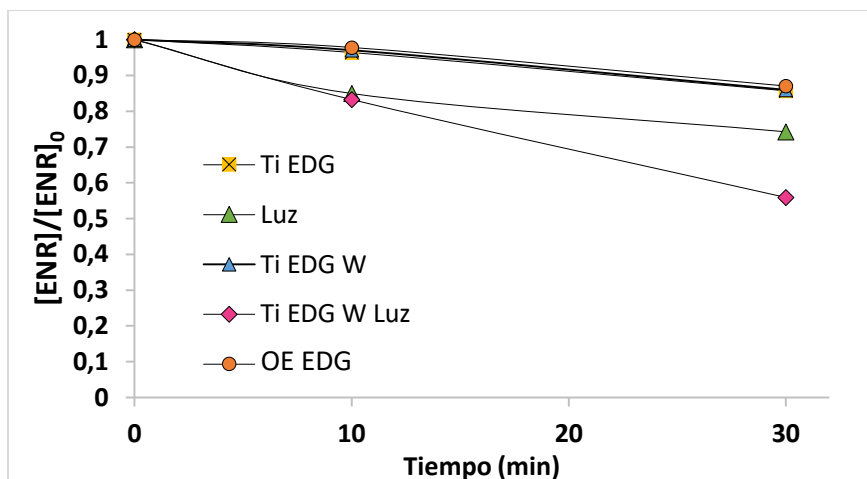


Figura 10. Evolución ENR frente al tiempo en disolución  $Na_2SO_4$  0,05 M y 18 mg/L ENR (Muestra D)

En la figura 10 se puede observar una tendencia similar en los experimentos Ti EDG, Ti EDG W y OE EDG, lo que implica que el añadir wustita al medio o utilizar el ánodo DSA dopado en vez el de titanio no ofrece ninguna ventaja frente a la configuración Ti EDG. Esto puede deberse a que en el caso del ensayo Ti EDG W la presencia de wustita no tiene una influencia considerable en la oxidación de la ENR y en el caso OE EDG la aportación de peróxido de hidrógeno en el ánodo DSA es despreciable frente a las generadas en el cátodo. Mientras que los sistemas que utilizan luz (Luz y Ti EDG W Luz) se ve una mayor disminución de antibiótico con respecto a los casos anteriores debido a que la molécula es fotodegradable como ya se ha explicado anteriormente. Además el ensayo que presenta una mayor eficiencia es aquel que fomenta el proceso electrofoto-Fenton, el cual es capaz de eliminar un 46% de antibiótico del medio frente a un 15% en el caso con sólo Luz, el cual es el siguiente más eficaz. Es posible que aumentando el tiempo de reacción o aumentando la intensidad de corriente, se puedan conseguir mayores eficacias del proceso con la ventaja de no formar trihalometanos como en el caso de la formación de EACl.

### 5.2.2. Análisis de la evolución del COT, pH y AA.

En este estudio se utilizaron también como parámetros control, la medición del carbono orgánico total (COT), el pH y la actividad antibiótica (AA).

Se midió el carbono orgánico total de las muestras C y D (agua destilada y ENR, cambiando el electrolito, NaCl o  $Na_2SO_4$ ) para todas las configuraciones estudiadas (sin electrodo de difusión de gas (OE), o con el electrodo (OE EDG), adicionando wustita (OE EDG W) y adicionando también luz (OE EDG W luz), a tiempo cero y al finalizar la reacción a los 30 minutos para examinar si se había llevado a cabo la mineralización de la muestra, y los resultados se muestran en las Tablas 4 y 5.

**Tabla 4.** Valores COT muestra C (matriz agua destilada con NaCl 0,05M como electrolito soporte y 18 mg/L de enrofloxacin).

Tiempo 0	OE	OE EDG	OE EDG W	OE EDG W Luz
12,90	12,52	12,49	11,96	12,35

**Tabla 5.** Valores COT muestra D (matriz agua destilada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05M como electrolito soporte y 18 mg/L de enrofloxacin)

Tiempo 0	Luz	Ti EDG	Ti EDG W	Ti EDG W Luz
12,90	12,85	12,35	11,81	11,94

Como se puede observar los valores dados, son datos recogidos al finalizar los ensayos a los 30 minutos y se puede ver que son similares al valor inicial antes de comenzar la reacción, por tanto, no se produce la mineralización del antibiótico.

Otro parámetro que se midió fue el pH de la muestra por si el antibiótico se había convertido en posibles ácidos (Tablas 6 y 7).

**Tabla 6.** Valores pH muestra C (matriz agua destilada con NaCl 0,05M como electrolito soporte y 18 mg/L de enrofloxacin).

Tiempo 0	OE	OE EDG	OE EDG W	OE EDG W Luz
6,12	5,95	6,11	6,02	5,99

**Tabla 7.** Valores pH muestra D (matriz agua destilada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05M como electrolito soporte y 18 mg/L de enrofloxacin)

Tiempo 0	Luz	Ti EDG	Ti EDG W	Ti EDG W Luz
6,12	6,20	6,06	5,93	5,89

Los valores también son similares con respecto al valor inicial por tanto no se han formado ácidos. Probablemente se han formado especies intermedias derivadas del antibiótico.

Por último se realizó el seguimiento de la actividad antibiótica (AA), para comprobar si disminuye con la degradación del antibiótico, ya que los compuestos intermedios podrían seguir teniendo esta propiedad. Se utilizaron las mismas condiciones que en el apartado 5.2.1. (200 ml de muestra, con una intensidad de corriente de 0,02 A, con/sin luz y con/sin wustita).

La Figura 11 muestra el diámetro del halo de inhibición frente al tiempo de reacción en condiciones de formación de EACI (muestra C) para todos las configuraciones estudiadas.

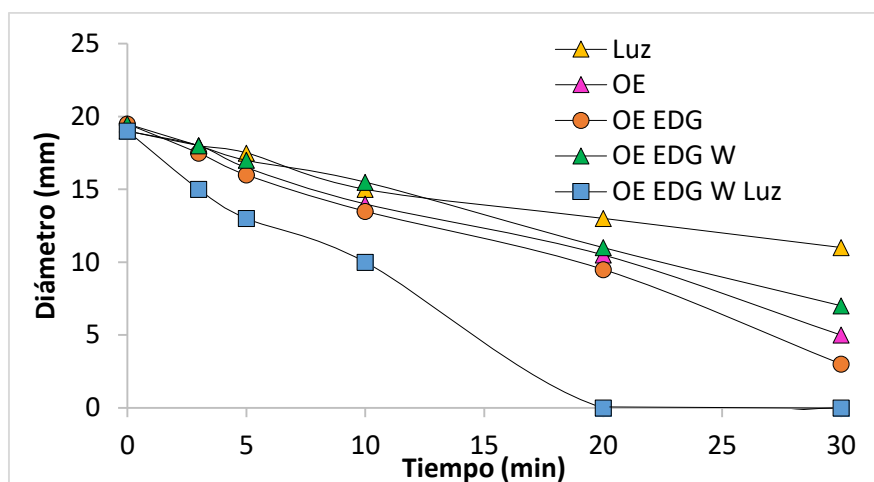


Figura 11. Disminución de actividad antibiótica (AA) con el tiempo en disolución 0,05 M NaCl y 18 mg/L ENR (Muestra C)

Mientras que la Figura 12 muestra el diámetro del halo de inhibición frente al tiempo de reacción en condiciones de formación de  $H_2O_2$  (muestra D).

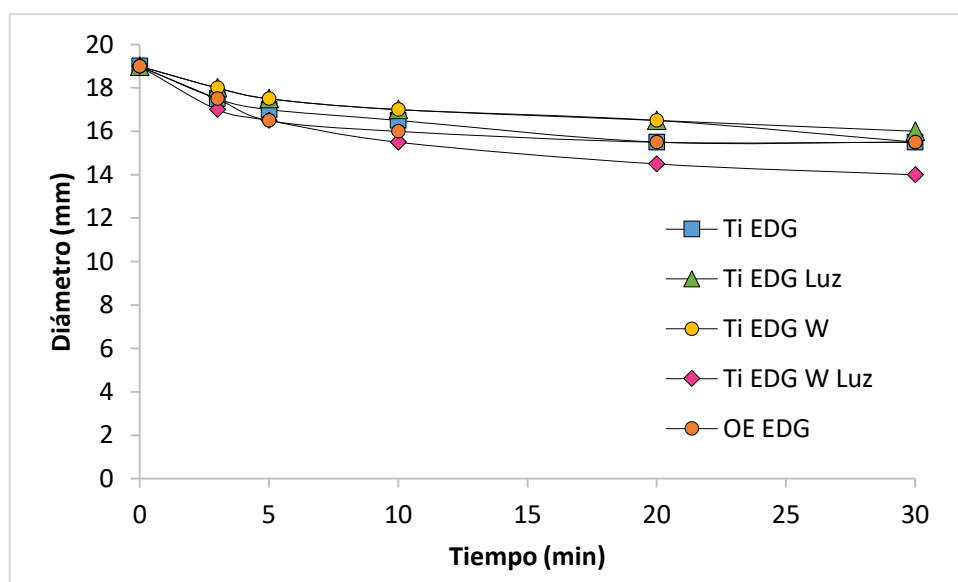


Figura 12. Disminución de actividad antibiótica (AA) con el tiempo en disolución 0,05 M  $Na_2SO_4$  y 18 mg/L ENR (Muestra D)

Al igual que en el seguimiento del antibiótico por cromatografía (Figuras 9 y 10), los procesos con mejores rendimientos son aquellos que promueven la formación de EACl, ver Figuras 11 y 12, sobre todo el proceso electrofoto-Fenton (OE EDG W Luz). En el caso de los procesos utilizados en la formación de  $H_2O_2$  (Ti EDG, Ti EDG W, Ti EDG W Luz) y como el proceso con sólo luz, se observa que en el seguimiento por cromatografía aún queda molécula en disolución por lo que cabe esperar que su actividad antibiótica no se haya reducido tanto como aquellos procesos en los que la concentración de antibiótico es mínima.

Por tanto, destacar que los procesos donde las especies activas de cloro están presentes son más efectivos que aquellos donde está presente sólo peróxido de hidrógeno, más concretamente, el ensayo más efectivo es el que implica el proceso electrofoto-Fenton (OE EDG W Luz) ya que consigue casi una total degradación del antibiótico y eliminan la actividad

antibiótica de éste en menos de 30 minutos de reacción, su inconveniente es la formación de trihalometanos.

### 5.2.3. Influencia de la matriz acuosa

Tras la realización de todos los experimentos anteriores en agua destilada, se realizaron ensayos con agua residual urbana (AR) de depuradora real y como electrolito soporte cloruro de sodio (muestra E: matriz agua de salida de la EDAR de Tudela con NaCl 0,05M como electrolito soporte con 18 mg/L de enrofloxacin) y utilizando 0,02 A de intensidad de corriente.

Se realizaron tres tipos de experimentos:

- Oxidación electroquímica: ánodo de DSA dopado y el cátodo de EDG (OE EDG)
- Oxidación electroquímica asistida con radiación solar (OE EDG Luz)
- Proceso electrofoto-Fenton con wustita (OE EDG W Luz)
- En la Figura 13, se muestra la generación de especies oxidantes frente al tiempo de reacción.

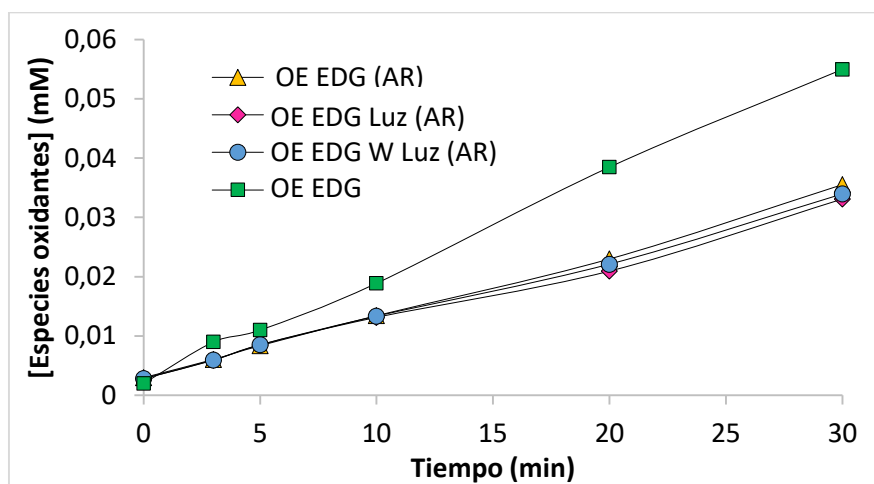


Figura 13. EACI formadas en agua residual real

En los tres sistemas de tratamiento objeto de estudio se forman una cantidad similar de especies oxidantes (Figura 12). Además, si se comparan las especies aquí formadas frente a las formadas con la misma configuración experimental pero en agua destilada (Figura 5), hay una notable disminución de estas especies por lo que presumiblemente se estén consumiendo más especies por la posible oxidación de otras moléculas presentes en la matriz.

En la Figura 14 se muestra la evolución del antibiótico objeto de estudio,  $[ENR]/[ENR]_0$ , frente al tiempo de reacción.

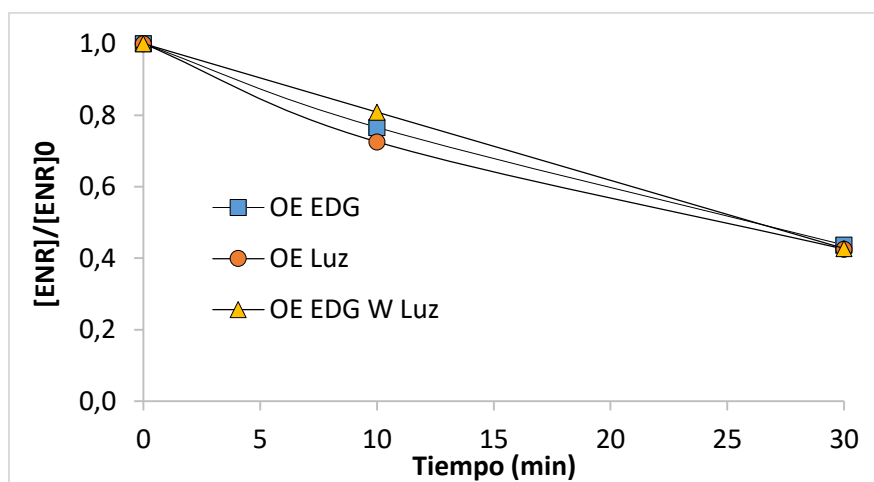


Figura 14. Evolución de ENR en agua residual real

Se puede observar, que en los tres casos la degradación de ENR no llega a más de 58%, esto puede deberse a que la matriz de agua residual real es considerablemente más compleja que la matriz de agua destilada, como se puede observar en la composición de un agua residual urbana, Tabla A2 del Anexo III [36], habiendo especies presentes en dicha matriz con más facilidad de oxidarse que el antibiótico.

La evaluación de la actividad antibiótica en los distintos procesos estudiados (Figura 15) muestra que la actividad antibiótica se reduce también en menor medida respecto a los resultados obtenidos en agua destilada (Figura 11 y 12). La Figura 15 muestra el diámetro del halo de inhibición frente al tiempo de reacción.

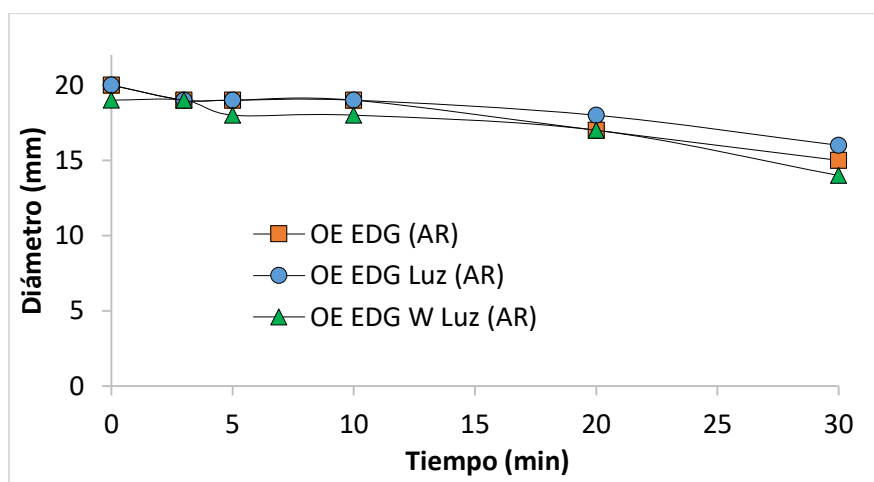


Figura 15. Pérdida de actividad antibiótica (AA) en agua residual real

Al igual que en el análisis del seguimiento de la ENR por cromatografía se observa una disminución más lenta de este parámetro con el tiempo por la presencia de especies con más facilidad de oxidarse en la matriz.

### 5.3. Procesos de desinfección

Una vez determinada la capacidad de los sistemas de tratamiento para degradar el antibiótico (ENR) se evaluó su alcance en la inactivación de bacterias. Se usaron dos cepas establecidas por legislación como indicadores de contaminación, *E.coli* y *Enterococcus spp*



(muestras F y G: matriz agua destilada,  $10^5$  UFC/100mL de *Escherichia coli* y  $10^5$  UFC/100mL de *Enterococcus spp.* modificando el electrolito 0,05M: NaCl o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  respectivamente).

Las Figuras 16a y 16b muestran la evolución de las dos cepas en función del tiempo para las diferentes condiciones de tratamiento estudiadas en este trabajo.

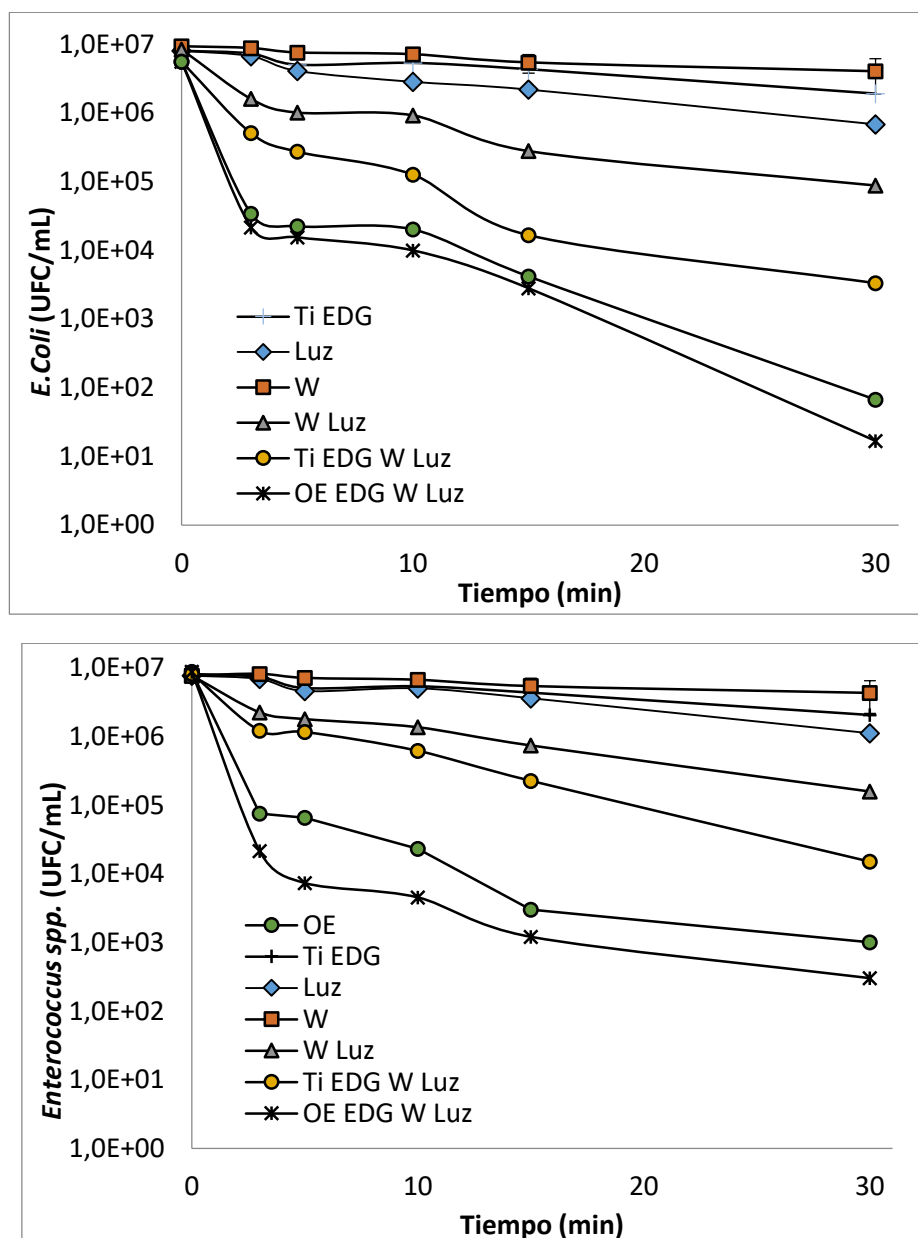


Figura 16. Inactivación de a) *E. coli* y b) *Enterococcus spp.* bajo diferentes condiciones experimentales

Como se puede observar, por un lado existen diferencias considerables en los perfiles de inactivación en función del proceso aplicado, pero además se alcanza una ligera mayor inactivación en todos los casos para *E. Coli* en comparación con *Enterococcus spp.*, lo que podría tener que ver directamente con las diferencias estructurales que existen entre las paredes celulares, pues *Enterococcus spp.*, Gram-positivas, presentan una capa homogénea de 20 a 80 nm de grosor de peptidoglicano, mientras que las Gram-negativas como el *E.Coli* contienen una capa de peptidoglicano de 2 a 7 nm y está recubierta por una membrana externa de 7 a 8 nm de grosor.

Para comprender lo que ocurre en cada sistema, se llevaron a cabo experimentos de control exponiendo a los microorganismos sólo a luz solar (Luz) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Ti EDG). En ambos casos la evolución de la concentración con el tiempo mostró que tras 30 minutos de reacción hay una disminución de menos de un orden de magnitud para ambas bacterias. No obstante, bajo cada una de las configuraciones estudiadas tal inactivación puede ser ocasionada por diferentes vías. Así, en el caso de la luz, la absorción celular de la radiación UVA (ver Anexo IV), promueve la formación de ROS (especies reactivas de oxígeno), mediante reacciones de foto-oxidación [37][38] o por un proceso foto-Fenton intracelular, en el que interviene el  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido por las células durante la respiración o por la activación de flavoenzimas [39] [40] y el hierro liberado por acción de la radiación UVA de las ferritinas, de clústeres de sulfuro de hierro o complejos que forma con proteínas enterobactinas. Las ROS generadas pueden alterar el ADN, ARN, lípidos y/o proteínas, mediante complejas reacciones que producen la pérdida de las funciones celulares, mutaciones y bloqueo de la replicación del ADN [41]. No obstante, los efectos causados podrían ser contrarrestados por el proceso de fotoreactivación (específicamente por la acción reparadora de la enzima fotoliasa), de ahí que no se logre una mayor inactivación en el tiempo estudiado. Cabe destacar que en la cámara solar se fijó una temperatura para garantizar que ésta no afectara a los sistemas estudiados.

En presencia solo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  la inactivación está asociada a la concentración  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pues a “bajas” concentraciones circundantes (1-3 mM) puede ser promovida por un proceso Fenton intracelular, mientras que a “altas” (>20 mM) ocurriría a través de la reacción directa del  $\text{H}_2\text{O}_2$  con la membrana celular [42]. Como ya fue analizado en el apartado 5.1.2., los experimentos llevados a cabo con el cátodo EDG ELAT™ LT-1400 muestran la generación y acumulación hasta una concentración aproximada de 0,4 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  electrogenerado durante los 30 minutos. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un producto normal de la respiración celular, no obstante en el interior de la célula su concentración es regulada por las enzimas catalasas y peroxidasas, de tal forma que no sobrepase el orden nanomolar, estableciéndose un complejo que puede ser alterado cuando el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el medio supera las concentraciones del interior de la célula [43]. Seaver e Imlay [44] han demostrado que, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se introduce por difusión a través de la membrana, como parte de la regulación osmótica celular, por lo que se sobrepasa la capacidad de las enzimas reguladoras, se favorece la liberación del hierro presente en las biomoléculas promoviendo un proceso Fenton interno que provocaría un detrimento general de la viabilidad celular. Por su parte, cuando solo se encuentra la wustita en la matriz no se observa ningún tipo de inactivación, lo cual es consecuente al considerar la inexistencia de compuestos orgánicos que puedan acomplejar y solubilizar el hierro, el área superficial de la wustita es casi indeterminable (muy baja) al compararla con otros óxidos de hierro [45] por lo que es poco probable la absorción de las bacterias en la superficie del óxido.

La Figura 16 muestra también que la exposición de la matriz acuosa en la que está presente el óxido de hierro con radiación solar logra inactivaciones entre uno y dos órdenes de magnitud para *E.coli* y *Enterococcus spp.*, respectivamente, como consecuencia de efecto sinérgico de la radiación en la bacteria en sí por la inactivación de la catalasa, que regula la concentración del  $\text{H}_2\text{O}_2$  pero también por la foto-disolución del hierro presente en la superficie del óxido [46], el cual podría atravesar la membrana celular y participar en un proceso Fenton intracelular. Si eventualmente el hierro lixiviado se encuentra en el menor estado de oxidación ( $\text{Fe}^{+2}$ ) puede ser oxidado por el oxígeno disuelto, dando lugar a la formación de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  [47], una

especie reactiva de oxígeno con menor potencial de oxidación que el  $\cdot\text{OH}$  pero con un mayor tiempo de vida media.

Cuando la combinación wustita-radiación solar es complementada con la electrogeneración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con el EDG (proceso electrofoto-fenton) la inactivación aumenta considerablemente de dos a cuatro órdenes de magnitud por la evidente formación de  $\cdot\text{OH}$  como consecuencia de la reacción de Fenton en el seno de la matriz (Ecuación 1) que es favorecida por la fotoregeneración del  $\text{Fe}^{+2}$ .

Sí el ánodo de  $\text{IrO}_2$  dopado con Sb-Sn se acopla al sistema, como se comprobó en las anteriores secciones, las especies activas de cloro serían las responsables de la inactivación bacteriana en más de cinco ordenes de magnitud para cada bacteria. Esto se atribuye a la penetración de  $\text{HClO}$  en la célula microbiana a través de la pared celular y la membrana. Se cree que el mecanismo que propicia la actividad germicida del  $\text{HClO}$  y  $\text{ClO}^-$  es la inhibición de la actividad enzimática esencial para el crecimiento, daño a la membrana y ADN, y quizás una lesión en el transporte de membrana [48]. Además, el estrés producido por el  $\text{HClO}$  también se sugiere para generar especies oxidativas nocivas que pueden dañar otros componentes celulares [49]. Finalmente al combinar tanto el electrodo de  $\text{IrO}_2$  dopado con Sb-Sn y el EDG en presencia de wustita y se irradia con luz solar se observa una ligera mejoría en la inactivación como resultado de la reacción de Fenton.

## 6. Conclusiones

El trabajo desarrollado en la presente memoria, ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

- La molécula es sensible a la radiación solar, por lo que los procesos que impliquen el uso de luz se verán favorecidos.
- Los procesos más eficaces son aquellos que fomentan la formación de especies activas, permitiendo una mayor degradación del antibiótico en el mismo tiempo que formando solamente peróxido de hidrógeno. Siendo, más concretamente, el proceso electrofoto-Fenton el más eficaz de todos los expuestos.
- La problemática del uso de especies activas de cloro es la formación de trihalometalos por su efecto cancerígeno.
- En el caso de los procesos en los que se utiliza como electrolito soporte sulfato de sodio, el único proceso viable es el electrofoto-Fenton, el cual permite más del 50% de eliminación del antibiótico, permitiendo eliminarlo a tiempos mayores sin el inconveniente de los THM.
- La composición de la matriz es crítica, ya que la degradación se verá favorecida si en el medio hay especies más fácilmente oxidables que el antibiótico, ya que los oxidantes se verán consumidos preferiblemente por estas especies consiguiendo una mejor degradación del antibiótico.

- La desinfección de aguas mediante los procesos estudiados indica que el sistema más eficiente vuelve a ser el utilizar el ánodo DSA dopado y el cátodo EDG en presencia de wustita y radiación solar.
- Al igual que en los casos de degradación, las EACl son las especies más eficaces siendo responsables de una mayor inactivación debido a la penetración del HClO en la célula, el cual produce daños irreversibles en la membrana y ADN.

Con perspectivas de futuro para la continuación de este proyecto se proponen las siguientes sugerencias:

- Utilizar otros óxidos de hierro, por ejemplo magnetita o goethita, en vez de wustita para observar cual es más eficiente a la hora de la eliminación de compuestos orgánicos y bacterias patógenas.
- Aumentar la intensidad de corriente para comprobar si favoreciendo la reacción electrofoto-Fenton en sistemas en los que se utiliza como electrolito soporte el sulfato de sodio se consigue una degradación mayor en el mismo tiempo y así evitar la formación de THM.
- Aumentar el área superficial del electrodo por la misma razón expuesta en el caso anterior.
- Estudiar la eliminación de otros antibióticos para observar si su degradación es viable por estos procesos propuestos.
- Estudiar la estructura de las especies secundarias formadas mediante y verificar si ha perdido su propiedad tóxica o sigue poseyéndola.
- Estudiar la viabilidad de hacer una separación previa del antibiótico y las bacterias en la matriz para su posterior degradación.

## 7. Bibliografía

- [1] A. C. Grandjean, S. M. Campbell. *Hidratación: Líquidos para la Vida*. ILSI Norteamérica/ILSI de México, A.C. **2006**.
- [2] D. G. Rao, R. Senthilkumar, J. A. Byrne, S. Feroz. *Water treatment: advances processes and Technologies*. CRC Press. **2012**.
- [3] A. López Martín. *Evolución de tecnologías en el tratamiento de aguas y fangos en EDARs, para la reducción de microorganismos con riesgo sanitario y ambiental*. Tesis doctoral. **2017**. Universidad de Zaragoza.
- [4] Emma Martínez López. *Situación actual de los contaminantes emergentes en las aguas residuales: efectos ambientales y para la salud pública*. Conferencia y reunión del Grupo de Trabajo Agua y Energía de la Comisión Intermediterránea (CIM) de la Conferencia de Regiones Periféricas Marítimas. **2016**.

- [5] Rafael Marín Galvín. *Contaminación emergente: sustancias prioritarias y preferentes, productos farmacéuticos, drogas de abuso, disruptores endocrinos, microplásticos y patógenos emergentes*. vol. no 24, **2017**.
- [6] N. Bolong, A. F. Ismail, M. R. Salim, T. Matsuura. *A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal*. Desalination, **2009**. 238, 229-246
- [7] Directiva 91/271/CEE. **1991**. Directiva del Consejo de 21 de mayo de 1991 sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas.
- [8] A. López, R. Mosteo, J. Gómez, A. M. Lasheras, P. Goñi, M. P. Ormad. *Evolución de bacterias patógenas en el tratamiento de aguas residuales urbanas*. Aguasresiduales.info. **2016**.
- [9] F. G. Calvo-Flores, J. Isac-Garcia, J. A. Doblado. *Emerging pollutants. Origin, structure and properties*. Wiley-VCH, **2018**.
- [10] RD 1620/2007. Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. **2007**.
- [11] H. F. Diao, X. Y. Li, J. D. Gu, H. C. Shi, Z. M. Xie. *Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction*. Process Biochemistry, **2004**. 39, 1421-1426.
- [12] J. Hoigné, H. Bader. *Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water—I: Non-dissociating organic compounds*. Water Research, **1983**. 17, 173-183.
- [13] A. Fujishima, T. N. Rao, D. A. Tryk. *Titanium dioxide photocatalysis*. Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews, **2000**. 1, 1-21.
- [14] S. Malato, P. Fernández-Ibáñez, M. I. Maldonado, J. Blanco, W. Gernjak. *Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends*. Catalysis Today, **2009**. 147, 1-59.
- [15] F. Haber, J. Weiss. *The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts*. Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, **1934**. 147, 332-351.
- [16] J. L. Otero, N. Mestorino, J. O. Erracalde. *Enrofloxacin: una fluoroquinolona de uso exclusivo en veterinaria. Parte II: farmacocinética y toxicidad*. Analecta Veterinaria, **2001**. 1, 42-49.
- [17] A. Safarzadeh-Amiri, J. R. Bolton, S. R. Cater. *The use of iron in advanced oxidation processes*. Advanced Processes and Technologies, 1996. 1, 18-26
- [18] A. A. Morales Pérez. *Sistemas de inactivación de huevos de Ascaris suum presentes en agua basados en nanocatalizadores de óxidos de hierro soportados en carbón activado y zeolita*. Tesis doctoral. **2013**. Universidad Nacional Autónoma de México.
- [19] A. El-Ghenymy, P. L. Cabot, F. Centellas, J. A. Garrido, R. M. Rodríguez, C. Arias, E. Brillas. *Mineralization of sulfanilamide by electro-Fenton and solar photoelectro-Fenton in a pre-pilot plant with a Pt/air-diffusion cell*. Chemosphere, **2013**. 91, 1324-1331.
- [20] J. Ruiz, C. Arias, E. Brillas, A. Hernández-Ramírez, J. M. Peralta-Hernández. (2011). *Mineralization of Acid Yellow 36 azo dye by electro-Fenton and solar photoelectro-Fenton processes with a boron-doped diamond anode*. Chemosphere, **2011**. 82, 495-501.
- [21] F. A. Rodríguez, M. N. Mateo, R. Dominguez, E. P. Rivero, I. González. *Electrochemical treatment of indigo carmine solutions via active chlorine in a FM01-LC reactor using DSA (Ti/IrO<sub>2</sub>/SnO<sub>2</sub>/Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) electrodes*. The Electrochemical Society, **2011**. 36, 529-538.
- [22] B. J. Hernlem. *Electrolytic destruction of urea in dilute chloride solution using DSA electrodes in a recycled batch cell*. Water Research, **2005**. 39, 2245-2252.
- [23] G. R. P. Malpass, D. W. Miwa, S. A. S. Machado, P. Olivi, A. J. Motheo. *Oxidation of the pesticide atrazine at DSA® electrodes*. Journal of Hazardous Materials, **2006**. 137, 565-572.

- [24] M. Castanho, G. R. P. Malpass, A. J. Motheo. *Photoelectrochemical treatment of the dye reactive red 198 using DSA® electrodes*. Applied Catalysis B: Environmental, **2006**. 62, 193-200.
- [25] D. Rajkumar, J. G. Kim. *Oxidation of various reactive dyes with in situ electro-generated active chlorine for textile dyeing industry wastewater treatment*. Journal of Hazardous Materials, **2006**. 136, 203-212.
- [26] C. Comninellis. *Electrocatalysis in the electrochemical conversion/combustion of organic pollutants for waste water treatment*. Electrochimica Acta, **1994**. 39, 1857–1862.
- [27] S. D. Jojoa-Sierra. *Evaluación de metodos electroquimicos: oxidación anódica, electro-fenton y electro-foto-fenton para la degradación de fluoroquinolonas en aguas*. Tesis doctoral, **2015**. Universidad de Antioquia.
- [28] R. H. Petrucci, F. G. Herring, J. D. Madura, C. Bissonnette. *Química General*. Pearson 10ª edición, **2011**.
- [29] R. K. Kwar, P. S. Chigare, P. S. Patil. *Substrate temperatura dependent structural, optical and electrical properties of spray deposited iridium oxide thin films*. Applied Surface Science, **2003**. 206, 90-101.
- [30] S. D. Jojoa-Sierra, J. Silva-Agredo, E. Herrera-Calderon, R. A. Torres-Palma. *Elimination of the antibiotic norfloxacin in municipal wastewater, urine and seawater by electrochemical oxidation on IrO<sub>2</sub> anodes*. Science of the Total Environment, **2017**. 575, 1228-1238.
- [31] H. Wang, D-Z. Sun, Z-Y. Bian. *Degradation mechanism of diethyl phthalate with electrogenerated hydroxyl radical on a Pd/C gas-diffusion electrode*. Journal of Hazardous Materials, **2010**. 180, 710-715.
- [32] Fuel Cell Store. CeTech Carbon Cloth with MPL – W1S1009. (<https://www.fuelcellstore.com/cetech-w1s1009>) Fecha de consulta: 23 de octubre de 2018.
- [33] Fuel Cell Store. ELAT™ LT-1400W. (<https://www.fuelcellsetc.com/store/ELAT-LT-1400>) Fecha de consulta: 23 de octubre de 2018.
- [34] A. Albini, S. Monti. *Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones*. Chemical Society Reviews, **2003**. 32, 238-250.
- [35] M. Deborde, U. von Gunten. *Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment-Kinetics and mechanisms: A critical review*. Water Research, **2008**. 42, 13-51.
- [36] Metcalf & Eddy. *Ingeniería de las aguas residuales*. S.A. McGraw Hill/Interamericana de España 3ª Edición. **2002**.
- [37] J-L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet J. *Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, **2001**. 63, 88-102.
- [38] G. P. Pfeifer, Y-H. You, A. Besaratinia. *Mutations induced by ultraviolet light*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, **2005**. 571, 19-31.
- [39] P. E. Hockberger, T. A. Skimina, V. E. Centonze, C. Lavin, S. Chu, S. Dadras, J. K. Reddy, J. G. White. *Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in mammalian cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, **1999**. 96, 6255-6260.
- [40] J. A. Imlay. *Pathways of oxidative damage*. Annual Review of Microbiology, **2003**. 57, 395-418.
- [41] E. Cabiscol, J. Tamarit, J. Ros. *Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species*. International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology, **2000**. 3, 3-8.
- [42] S. Giannakis, M. I. Polo-López, D. Spuhler, J. A. Sánchez Pérez, P. Fernández Ibáñez, C. Pulgarin. *Solar disinfection is an augmentable, in situ-generated photo-Fenton reaction—Part 1: A review of the mechanisms and the fundamental aspects of the process*. Applied Catalysis B: Environmental, **2016**. 199, 199-223.

- [43] E. Cárdenas, A. Morales, M. Torres. *Life cycle and reproductive parameters of Clerada apicicornis signoret (hemiptera: lygaeidae) under laboratory conditions*. Mem Inst Oswaldo Cruz, **2001**. 96, 127-131.
- [44] L. C. Seaver, J. A. Imlay. *Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, **2001**. 183, 7182-7189.
- [45] S. Giannakis, S. Liu, A. Carratalà, S. Rtimi, M. Bensimon, C. Pulgarin. *Effect of Fe(II)/Fe(III) species, pH, irradiance and bacterial presence on viral inactivation in wastewater by the photo-Fenton process: Kinetic modeling and mechanistic interpretation*. Applied Catalysis B: Environmental, **2017**. 204, 156-166.
- [46] B. M. Voelker, F. M. M. Morel, B. Sulzberger. *Iron redox cycling in surface waters: effects of humic substances and light*. Environmental Science & Technology, **1997**. 31, 1004-1011.
- [47] D. Spuhler, J. A. Rengifo-Herrera, C. Pulgarin. *The effect of  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $H_2O_2$  and the photo-Fenton reagent at near neutral pH on the solar disinfection (SODIS) at low temperatures of water containing Escherichia coli K12*. Applied Catalysis B: Environmental, **2010**. 96, 126-141.
- [48] S. Fukuzaki. *Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes*. Biocontrol Science, **2006**. 11, 147-157.
- [49] S. Dukan, D. Touati. *Hypochlorous acid stress in Escherichia coli: resistance, DNA damage and comparison with hydrogen peroxide stress*. Journal of Bacteriology, **1996**. 178, 6145-6150.

